"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و پنجم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

DOR: 20.1001.1.23223243.2021.19.1.29.0

سازوکارهای فیزیولوژیکی و مولکولی تحمل تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های جهش یافته برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) در شرایط تنش شوری

Physiological and molecular mechanisms of oxidative stress tolerance in mutant genotypes of rice (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) under salt stress conditions

لیلا خزائی[۱] و رضا شیرزادیان خرم‌آباد[۲]

چکیده

خزائی، ل.، و ر. شیرزادیان خرم‌آباد. ۱۴۰۲. سازوکارهای فیزیولوژیکی و مولکولی تحمل تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های جهش یافته برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) **در شرایط تنش شوری. نشریه علوم زراعی ایران. ۲۵ (۲): ۲۰۶ -۱۹۰.**

شوری خاک از جمله عوامل تنش‌زای محیطی است که باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش رشد و تولید گیاهان زراعی می‌شود. در این تحقیق که در سال ۱۳۹۸ در محلول غذایی در آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) اجرا شد، فعالیت آنزیمی و بیان ژن‌های موثر در دفاع آنتی‌اکسیدانی دو ژنوتیپ برنج جهش یافته منتخب متحمل به تنش شوری (*em4hs290* و *em4hs84*) همراه با رقم هاشمی (والد غیر جهش یافته)، رقم FL478 (متحمل) و رقم IR28 (حساس) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیمی پراکسیداز (POX) در ارقام هاشمی و IR28 و آسکوربات پراکسیداز (APX) در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل و رقم متحمل FL478 به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. نتایج بیان ژن‌های مرتبط با تنش شوری نیز نشان داد که علیرغم رفتار متفاوت ژن‌ها در ژنوتیپ‌های برنج مورد ارزیابی، میزان کل بیان ژن‌های *OSGR1*، *DREB2B*، *OsAOX1C* و *POX1* در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل بیشتر از رقم حساس بود. فراوانی رونوشت ژن‌های *OsAPX2* در ژنوتیپ‌های متحمل در شرایط تنش شوری کوتاه‌مدت به‌طور معنی‌داری بیشتر بود و با حذف پراکسید هیدروژن و افزایش فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز همبستگی داشت. عدم شباهت در الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه بین دو ژنوتیپ جهش یافته متحمل و والد آنها (رقم هاشمی) نشان داد که القای جهش می‌تواند از طریق بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش توانایی ژنوتیپ‌های برنج برای تحمل تنش شوری در مقایسه با ارقام والد حساس آنها شود. به‌نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌های جهش یافته برنج رشد مناسبی را در شرایط تنش شوری خاک نیز داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، برنج، بیان ژن، تحمل، تنش شوری و موتاسیون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶ این مقاله مستخرج از رساله دکتری نگارنده اول با شماره ۱۲۸۷۹ در معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان است

۱- دانش‌آموخته دکتری دانشگاه گیلان و محقق موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۲- دانشیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران (مکاتبه‌کننده) (پست الکترونیک: r.shirzadian@guilan.ac.ir)

Physiological and molecular mechanisms of oxidative stress tolerance in mutant genotypes of rice (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) under salt stress conditions

Khazaie, L.[1] and R. Shirzadian-Khoramabad[2]

ABSTRACT

Khazaie, L. and R. Shirzadian-Khoramabad. 2023. Physiological and molecular mechanisms of oxidative stress tolerance in mutant genotypes of rice (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) under salt stress conditions. **Iranian Journal of Crop Sciences. 25(1): 190-206. (In Persian).**

Introduction: Soil salinity is one of the environmental stresses that causes the accumulation of reactive oxygen species (ROS), and oxidative stress, and consequently, reduces crop growth and production. Antioxidative mechanisms are critical to protect cells from the adverse effects of ROS.

Material and Methods: Thhis study was conducted in nutrient solution in Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran in 2019. The enzymatic activity and expression of effective genes on antioxidant defense were examined in two selected mutant genotypes (*em3hs290 and em3hs84*) tolerant to salinity stress, with Hashemi local cultivar, FL478 (tolerant) and IR28 (sensitive) genotypes. Biochemical traits including the activity of antioxidant enzymes, peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase, and the relative expression of genes encoding transcription factors (*SNACI*, *DREB2B*, and *DREB2A*) and genes associated with oxidative stress (*OsAOX1C*، *POX1* ،*OsGR1* ،*OsAPX2 and OsGPX1*) were also measured and detected using real-time PCR technique.

Results: The results showed that enzymatic activity of peroxidase (POX) in control cultivars (cv. Hashemi and IR28 cultivars) and ascorbate peroxidase (APX) in tolerant mutant genotypes and FL478 cultivar increased significantly. The genes expression associated with salinity stress tolerance also indicated that despite the variable behavior of the genes in the studied mutant genotypes, the expression of *OSGR1*, *DREB2B*, *OsAOX1C* and *POX1* genes in studied tolerant mutants was more than susceptible cultivar. Transcript abundance of the *OsAPX2* gene was significantly higher in salt-tolerant genotypes under short-term salinity stress and correlated with peroxide hydrogen removal and increased activity of ascorbate peroxidase enzyme.

Conclusion: The lack of similarity in the expression pattern of studied genes between the two salt-tolerant mutant genotypes (*em4hs290* and *em4hs84*) and cv. Hashemi showed that the mutation could triger the salt-tolerance mechanisms in mutant genotypes, in comparison of cv. Hashemi, through emhancement of antioxidant enzymes activity in response to salt stress. It seemes that the mutant genotypes may have suitable growth in soil salinity conditions.

Key words: Antioxidant enzymes, Gene expression, Mutation, Rice, Salinity stress and Tolerance

Received: May, 2023 **Accepted: September, 2023**

1. PhD graduate, University of Guilan, Rasht, Iran. Researcher, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

2. Associate Prof., University of Guilan, Rasht, Iran. (Corresponding author) (Email: r.shirzadian@guilan.ac.ir)

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) منبع غذایی اصلی بیش از 3/5 میلیارد نفر در سراسر دنیا، به ویژه قاره آسیا است. در میان تنش های غیرزیستی، شوری خاک یکی از عوامل اصلی محدودیت رشد، نمو و عملکرد این گیاه راهبردی محسوب می‌شود. برآورد شده است که بیش از ۱۰۰۰ میلیون هکتار از اراضی دنیا شور یا سدیمی هستند و ۲۵ تا ۳۰ درصد از اراضی فاریاب دنیا (حدود ۷۰ میلیون هکتار) تحت تأثیر شوری خاک قرار داشته و از نظر تجاری فاقد بازدهی محسوب می‌شوند (Shahid *et al*., 2018). در میان غلات، برنج حساس‌ترین غله نسبت به شوری خاک در مراحل گیاهچه‌ای و مرحله گلدهی است که در غلظت ۳۰ میلی‌مول در لیتر کلرید سدیم (هدایت الکتریکی حدود ۳ دسی زیمنس بر متر)، رشد و عملکرد گیاه برنج به شدت کاهش می‌یابد (Lutts *et al*., 1995). گیاهان به تنش شوری از طریق درک و انتقال پیام‌های اسمزی و یونی به داخل سلول و به‌دنبال آن تغییر در ویژگی‌های سلولی، پاسخ می‌دهند (Nongpiur *et al*., 2020). درک سازوکارهای مولکولی تحمل تنش مبنایی می‌تواند به بهبود تنوع تحمل به تنش شوری در گیاه برنج کمک کند. علیرغم مطالعات گسترده در مورد بررسی سازوکار تحمل به شوری، پیشرفت‌های محدودی در به‌نژادی برای افزایش تحمل شوری بدست آمده است. پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های غیرزیستی با بیان چندین ژن و مسیرهای مولکولی و بیوشیمیایی همراه است. بسیاری از این ژنها به‌صورت مشترک در انواع تنش‌های محیطی بیان می‌شوند و ژنهایی که بیان آنها در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد در سه گروه ژنهای کنترل‌کننده جذب و انتقال سدیم و سایر نمک‌ها، ژنهای فعال در مسیرهای دفاعی و تنظیم اسمزی و ژنهای دخیل در تنظیم رشد گیاه در خاک‌های شور دسته‌بندی می‌شوند (Hanin *et al*., 2016). گزارش شده است که صدها ژن کدکننده عوامل رونویسی در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی درگیر هستند. این عوامل مسئول بیان ژن‌های فعال در تنش و مرتبط با تحمل و سازگاری گیاه هستند. خانواده عوامل رونویسی از قبیل (MYB/MYC, AP2/ERF, bZIP, NAC, HD-ZIP NF-Y,) در اثر تنش شوری القاء شده و تغییر در بیان برخی از این ژنها بر تحمل گیاه به تنش شوری اثر دارد (Zhu *et al*., 2010). عوامل رونویسی نوع NAC شامل *OsNAC6*،*SNAC1*، *OsNAC5* و *OsNAC10* از تنظیم کننده‌های واکنش به تنش‌های غیرزیستی در برنج هستند. تعدادی از ژنهای NAC که توسط تنش‌های خشکی، شوری بالا و سرما القاء می‌شوند، در برنج گزارش شده‌اند. *SNAC1* به‌عنوان یک جزء کلیدی در پاسخ به تنش در گیاه برنج شناسایی شده است. عوامل رونویسی DREB (The Dehydration Responsive Element Binding Protein) به دو نوع DREB1 و DREB2 تقسیم می‌شوند که این دو گروه نیز داری تعدادی زیر خانواده هستند که در گیاهان مختلف متفاوت هستند. برنج دارای حداقل چهار هم‌ساختار DREB2 است که از میان آنها *OsDREB2A* و *OsDREB2B* توسط تنش‌های خشکی، شوری بالا و گرما القاء می‌شوند (Matsukura *et al*., 2010).

تغییرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاه از جمله وزن بوته، طول برگ و ریشه و تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی در اثر تنش شوری معمولا با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) همراه است (Lee *et al*., 2001). گونه‌های فعال اکسیژن که به دلیل اثرات شوری بالا (هایپراسموتیک) و سمیت یونی به‌وجود می‌آیند، باعث آسیب به غشای سلول و فرآیندهای غشایی و مرگ سلول می‌شوند. کاهش سرعت فتوسنتز ناشی از شوری بالا باعث تسریع در تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست می‌شود. گیاهان سازوکارهایی را برای جلوگیری از اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن دارند

که به سازوکارهایی آنزیمی (با استفاده از آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) و غیر آنزیمی (تولید مولکول‌های آنتی‌اکسیدان مانند توکوفرول‌ها، آسکوربیک اسید و گلوتاتیون) تقسیم می‌شوند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ژن‌های آنها در چند گونه گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Bian and Jiang 2009; Scandalios, 2005). نتایج پژوهش کردرستمی و همکاران (Kordrostami *et al.*, 2017) روی تعدادی از ارقام برنج ایرانی در شرایط تنش شوری در محیط آبکشت نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ارقام متحمل به شوری به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. رونویسی ژن‌هایی که در متابولیسم آنتی‌اکسیدانی نقش دارند، سازوکارهای تحمل به تنش را تنظیم می‌کند. این تنظیمات برای تعریف سازوکارهای مربوط به تحمل شوری در برنج مورد نیاز هستند. گزارش شده است که در ارقام برنج با افزایش میزان شوری، شاخص های تنش اکسیداتیو از جمله رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابند. این افزایش معمولا در ارقام حساس به شوری بارزتر و به طور معنی‌داری بیشتر از ارقام متحمل است (Chawla *et al.*, 2013).

شناسایی سازوکارهای تحمل تنش شوری با هدف بهبود و اصلاح عملکرد ارقام در اراضی شور اهمیت بالایی دارد، بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثرات تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه و تغییرات ایجاد شده حاصل از آنها و همچنین الگوی بیان ژن‌های اسمزی و تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های موتانت منتخب نسل چهارم (M_4) (متحمل به شوری)، همراه با ارقام والد، متحمل و حساس به تنش شوری (شاهد) در شرایط گلخانه‌ای بوده است. شناسایی متابولیت‌های کلیدی و پاسخ‌ها و رونوشت‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با تنش شوری می‌تواند انتخاب فنوتیپ‌های مطلوب متحمل به شوری در برنج را بهبود دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در آزمایش شامل دو ژنوتیپ منتخب جهش یافته از والد هاشمی متحمل به شوری (*em4hs290* و *em4hs84*) (Khazaie *et al.*, 2023) بودند که همراه با والد غیر جهش یافته هاشمی و ارقام FL478 (متحمل) و IR28 (حساس) به شوری در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بذرهای ژنوتیپ‌های برنج پس از ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه، جهت جوانه‌دار کردن به ژرميناتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس منتقل شدند. بذرهای جوانه‌زده به صفحات یونولیت با ابعاد ۲×۳۰×۳۴ سانتی‌متر که سوراخ‌هایی با قطر یک سانتی‌متر در آن ایجاد شده بود منتقل و در هر سوراخ دو بذر جوانه‌زده قرار داده شدند. صفحه‌های یونولیت روی ظروف ۱۰ لیتری حاوی محلول یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) به‌حالت شناور قرار داده شدند. محلول هر هشت روز یکبار تعویض شد. هر ظرف حاوی پنج ژنوتیپ و از هر ژنوتیپ ۲۰ گیاهچه بود. pH محلول روی ۵/۵ تنظیم و هفته‌ای سه بار کنترل شد. پس از گذشت دو هفته، تنش شوری (۱۰ دسی‌زیمنس بر متر از منبع کلرید سدیم) براساس نتایج آزمایش تعیین غلظت مناسب شوری برای رقم والد هاشمی (Khazaie *et al.*, 2023) اعمال شد. تیمارهای تنش شوری در دو سطح بدون تنش (صفر) و تنش شوری (۱۰ دسی‌زیمنس بر متر) بر گیاهچه‌های سه برگی اعمال و میزان هدایت الکتریکی محلول یوشیدا به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. اثر تنش شوری شامل سفید شدن و نکروز برگ‌های پایین، کاهش سطح برگ‌ها، خشکیدگی نوک برگ‌ها، لوله‌شدن برگ‌ها و مرگ گیاهچه براساس استاندارد موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (Standard Evaluation of Genotypes

for Salinity Tolerance) ثبت شد. نمونه‌برداری جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی در سه مرحله ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری انجام شد. برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های عوامل رونویسی و تنش اکسیداتیو، نمونه‌برداری از اندام‌های هوایی سالم گیاهچه‌های جهش یافته (*em4hs290* و *em4hs84*) و ارقام شاهد پس از ۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تنش شوری و همچنین گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط بدون تنش انجام شد و سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از بافت برگ‌های ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش شوری و بدون تنش عصاره آنزیمی تهیه شد. برای این منظور، ۰/۱ گرم بافت برگ در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH= 7) عصاره‌گیری شد. عصاره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ و از مایع رویی برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.7) به روش چنس و ماهلی (Chance and Maehly, 1995) براساس میزان اکسید شدن گایاکول اندازه‌گیری شد. برای این کار ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج با یک میلی لیتر محلول پراکسیداز شامل گایاکول ۱۳ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن پنج میلی‌مولار و بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= 7) مخلوط و جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Libra S22, Biochrom, China) قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) با استفاده از روش کالیبورن (Claiborne, 1985) اندازه‌گیری شد. برای این کار ۱۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۲۰ میکرولیتر محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن به ۱/۸۴ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد. تغییرات جذب نمونه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. هر واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که باعث احیای یک میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه می‌شود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.1) براساس روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۱/۸ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد. کاهش جذب در اثر فعالیت آنزیم با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت دو دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که باعث اکسید شدن یک میکرومول آسکوربات در دقیقه می‌شود. آزمایش با سه تکرار مستقل به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل ژنوتیپ‌های برنج، تنش شوری و زمان (در چهار سطح) بودند. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS9.2 (SAS Institute, Cary NC) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند. برای رسم نمودارها و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌ها استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus ™ از نمونه‌های برگی انجام شد. سنجش کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از عکس‌برداری ژل آگارز هشت درصد در دستگاه ژل‌داک (Bio-Rad Geldoc 2000,UK) در معرض نور ماورای بنفش با طول موج ۳۱۲ نانومتر و سنجش کمیت آن با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA) انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم RevertAid Reverse Transcriptase و کیت سنتز cDNA شرکت Fermentas انجام شد. قبل از سنتز cDNA، برای حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA از تیمار DNase I (براساس دستورالعمل شرکت سازنده) استفاده شد. کنترل سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ژن اکتین (*Ubiquitin10, UBQ10*) برای کلیه نمونه‌ها انجام شد. به‌منظور بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده از واکنش کنترل

منفی که شامل کلیه مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (به‌غیر از cDNA) بود، استفاده شد. برای ارزیابی میزان بیان ژن‌ها، آغازگرهای مورد نیاز با استفاده از منابع مختلف انتخاب و پس از بررسی با نرم‌افزار آنلاین Primer-BLAST، آغازگرهای اختصاصی انتخاب شدند. برای طراحی آغازگرها با استفاده از شماره دسترسی ژن های مربوطه در سایت NCBI، توالی‌های مربوطه بدست آمدند. طراحی آغازگرها در سایت NCBI بر مبنای نرم‌افزار آنلاین Primer3Web, ver4 انجام شد. ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی (SNACI, DREB2B , DREB2A) و ژن‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو (*OsAOX1C* ، *POX1*، *OsGR1*، *OsAPX2* و *OsGPX1*) با بررسی عملکرد و نقش آنها در شرایط تنش شوری به عنوان ژن‌های هدف انتخاب شدند. از ژن (*UBQ10*) به عنوان کنترل استفاده شد (Huang *et al*., 2012).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های برنج

Table 1. Specifications of primers for gene expression of the studied genes in rice genotypes

نام ژن Gene name	توالی آغازگر (۳'←۵') Primer sequence (5'→3')	Length (bp)	طول محصول PCR Product length (bp)	دمای ذوب Melting temp. (ºC)	دمای اتصال Tm (ºC)	NCBI accession No.
Ubiquitin10	F-TGGTCACTAATCAGCCAGTTTGG	23	81	60.6	59	XM_015769228.1
	R-CACCACAAATACTTGACCAACAG	24		61.0		
SNAC1	F-CATGGTCCCGTTCTGAGGTG	20	316	61.4	60	KM265360.1
	R-CACACGTTGCAGCATCGATC	20		59.3		
DREB2A	F-AGATTGCTCCGTGCAAGTG	19	109	56.6	56	MN436788.1
	R-CTGGAGCTTCTGGTTTTGCT	20		57.3		
DREB2B	F-GCTTGTGCTTATGACGAGGC	20	97	59.6	58	XM_015784169.2
	R-GCTGCTAGTGCAACCTGAACG	21		62.1		
OsGPX1	F-AGCAACCTGCACTTATGCACT	21	159	57.8	58	XM_015780454.1
	R-CAGCAAGGAAATTTATTGACATGA	24		55.8		
OsAOXIC	F-GAGTCTCCAGCTCGACCTCC	20	160	63.4	56	XM_015768323.1
	R-CTCCCGGTGTTCTCCTTGG	19		60.8		
OsAPX2	F-CTCTCCTACGCCGACTTCTAC	21	136	61.7	60	XM_015791070.1
	R-AGGTGGTCAGAACCTTGTGT	20		57.3		
OsGR1	F-ATTGGTGGGTTCTCACATGTTA	22	110	56.5	60	XM_015833867.1
	R-ACCATTATTGGTCCGTTCTTGT	22		56.5		
POX1	F-CATCCCAGCTCCCAACAA	18	112	55.9	60	XM_015765904.1
	R-AGACATGCCAATGGTGTGG	19		56.6		

جهت بررسی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در فرایند Real time-QPCR از دستگاه (IQ5, Bio Bio Rad Rad, USA) و مستر (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Thermo Scientific) استفاده شد. تجزیه داده‌ها براساس مدل فافل با استفاده از نرم افزار تعیین بیان نسبی (Relative expression software tool REST) انجام شد (Pfaffl *et al*., 2002). کارایی تکثیر با استفاده از منحنی‌های استاندارد برای هر یک از ژن‌ها به صورت جداگانه و براساس رابطه ۱ محاسبه شد. الگوی ریاضی فافل کمیت نسبی ژن هدف را در مقایسه با ژن مرجع تعیین می‌کند (Pfaffl, 2002).

$$\boldsymbol{ratio} = \frac{(\mathrm{E_{target}})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-smaple)}} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

E_{target} کارایی تکثیر ژن هدف، E_{ref} کارایی تکثیر ژن مرجع و ΔCP_{target} و ΔCP_{ref} از طریق تفاضل Ct نمونه شاهد از Ct نمونه در شرایط تنش بدست می‌آیند. محاسبه کارایی تکثیر با استفاده از رابطه ۲ انجام شد.

$$E=10^{(-1/slope)} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

slope با استفاده از منحنی‌های استاندارد به‌دست آمد.

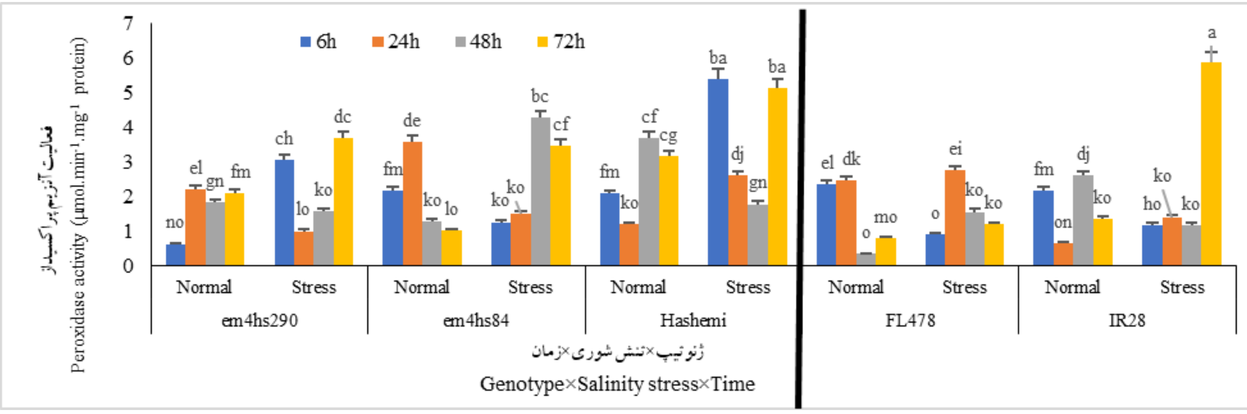
نتایج و بحث

اثرات تنش شوری به‌صورت سفید شدن و نکروز برگ‌های پایین، کاهش سطح برگ‌ها، خشکیدگی نوک برگ‌ها، لوله‌ای شدن برگ‌ها و مرگ گیاهچه‌های حساس مشاهده شد. در روز چهاردهم پس از اعمال تنش شوری، گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های متحمل، علائم جزئی مانند قهوه‌ای شدن نوک برگ‌ها را داشتند. گیاهچه‌های نسبتاً متحمل اثرات بیشتری روی برگ‌ها داشتند، یعنی برگ‌های مسن‌تر مرده و در برگ‌های جوان‌تر فقط قسمت‌های پایین آنها سبز باقی مانده بود. پس از دوهفته از اعمال تنش شوری، تنها دو ژنوتیپ جهش یافته و رقم FL478 موفق به تولید هر دو بخش ریشه‌چه و ساقه‌چه شدند و سایر ژنوتیپ‌ها از بین رفتند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش شوری و زمان و برهمکنش آنها بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. این موضوع نشان می‌دهد که کلیه صفات گیاهی اندازه‌گیری شده تحت تاثیر اثرات تیمارهای اعمال شده قرار گرفتند. معنی‌دار شدن برهمکنش تیمارها نشان‌دهنده تفاوت در فعالیت آنزیمی ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش شوری و بدون تنش بود. تنش شوری با تجمع پراکسید هیدروژن در برگ‌های برنج، باعث آسیب دیدن یکپارچگی غشای سلولی و افزایش حساسیت آن به تنش اکسیداتیو می‌شود (He *et al.*, 2014). آنزیم پراکسیداز با استفاده از مواد فنولیک به عنوان دهنده الکترون، باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Apel and Hirt, 2004). نتایج آزمایش نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه اعم از ژنوتیپ‌های جهش یافته انتخابی، والد هاشمی، رقم FL478 و رقم IR28 در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط بدون تنش، بیشتر بود. گزارش شده است که فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش شوری در هر دو رقم متحمل و حساس گندم (Mandhania *et al*. 2006) و در ذرت و شلغم (Kumar *et al*. 2007) و برنج (Chawla *et al.*, 2013) در ارقام متحمل بیشتر بود. نتایج برهمکنش ژنوتیپ و تنش شوری نشان داد که والد هاشمی در شرایط تنش شوری بیشترین (۳/۷۲ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و رقم FL478 در شرایط بدون تنش کمترین میزان فعالیت پراکسیداز (۱/۴۵ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) را داشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که رقم والد هاشمی و رقم حساس IR28 بیشترین واکنش را به تنش شوری داشته و ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل کمترین واکنش را داشتند. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل *em_4hs84* و *em_4hs290* نسبت به شرایط بدون تنش معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلیه ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش شوری در زمان‌های نمونه‌برداری متفاوت بود، اما بیشترین مقدار آن در رقم IR28 (۵/۸۸ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، ۷۲ ساعت پس از تنش شوری مشاهده شد (شکل ۱).

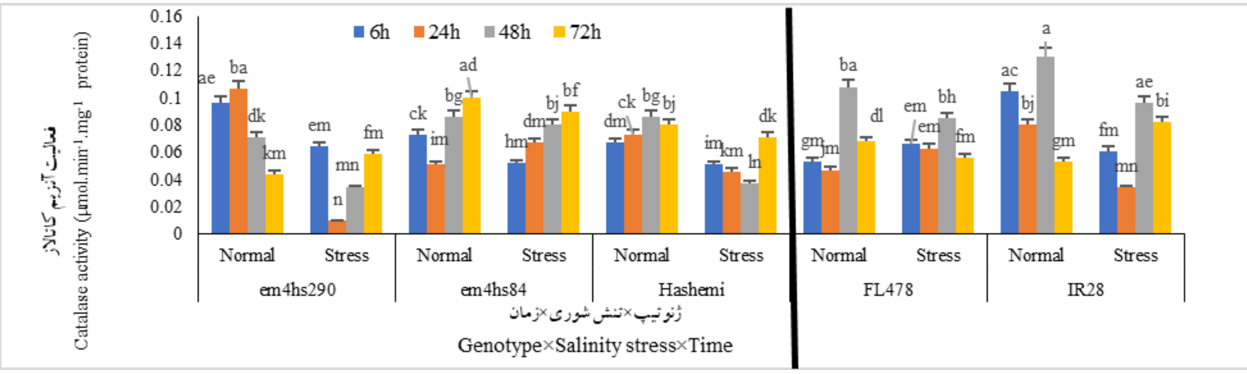
تنش شوری باعث افزایش تدریجی پراکسید هیدروژن در سلول‌ها می‌شود که برای فعالیت‌های متابولیک سلول سمی است. آنزیم کاتالاز نقش مهمی در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن طی فرآیند تنفس نوری دارد (Celik *et al.*, 2019). نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های برنج در شرایط تنش شوری و بدون تنش به جزء در رقم متحمل *FL478*، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. شوری باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های حساس به شوری، رقم IR28 و رقم والد هاشمی شد. کلیک و همکاران (Celik *et al.*, 2019) نیز با بررسی تنش اکسیداتیو روی دو رقم برنج (Osmancık-97 و Mevlutbey) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز به‌طور قابل‌توجهی بیشتر بود، در حالی که فعالیت کاتالاز در هر دو رقم در کلیه سطوح شوری

کمتر بود. برهمکنش شوری و رقم نشان داد که رقم IR28 در شرایط بدون تنش بیشترین (۰/۰۹۱) و ژنوتیپ جهش یافته *em₃hs290* در سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر کمترین (۰/۰۴۱ میکرومول در دقیقه بر میلی گرم پروتئین) فعالیت کاتالاز را داشتند. همچنین اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه در زمان‌های مختلف تنش شوری به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، اما تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در ۶ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری با فعالیت بیشتر در ژنوتیپ‌های *em₄hs290*، *IR28* و *FL478* همراه بود (شکل ۲). گزارش شده است که در مطالعه روی برگ‌های گیاه برنج، تنش شوری در برنج محتوای پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) را افزایش داده و باعث کاهش فعالیت کاتالاز (CAT) شد. از سوی دیگر، تنش شوری تأثیر کمی بر فعالیت



شکل ۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های جهش یافته انتخابی و ارقام شاهد برنج در برهمکنش تیمارهای ژنوتیپ و تنش شوری و زمان پس از اعمال شوری

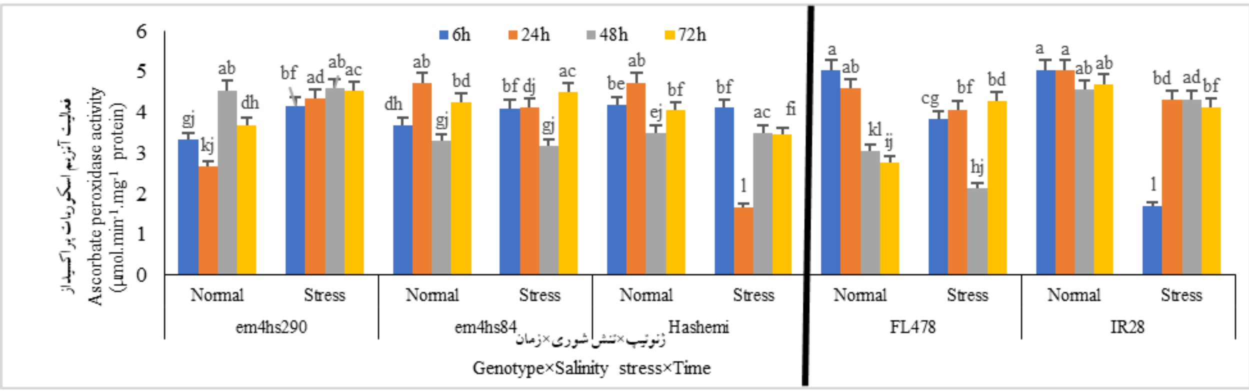
Fig. 1. Mean comparison of peroxidase enzyme activity in selected mutant genotypes and control cultivars of rice in interaction of genotype × salinity × time after salinity application



شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های جهش یافته انتخابی و ارقام شاهد برنج در برهمکنش تیمارهای ژنوتیپ و تنش شوری و زمان پس از اعمال شوری

Fig. 2. Mean comparison of catalase enzyme activity in selected mutant genotypes and control cultivars of rice in interaction of genotype × salinity × time after salinity application

گلوتاتیون ردوکتاز دارد (Lee *et al.*, 2001). این یافته‌ها با نتایج یاد شده مطابقت دارد. آسکوربات پراکسیداز اولین آنزیم چرخه گلوتاتیون اسکوربات است که نقش حیاتی در حذف پراکسید هیدروژن دارد. آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز تمایل بیشتری به حذف پراکسید هیدروژن دارد و حتی در غلظت‌های پایین نیز قادر به حذف آن است (Gill and Tuteja, 2010). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پی اعمال تنش شوری در والد هاشمی و IR28 در مقایسه با شرایط بدون تنش کمتر بود (شکل ۳).



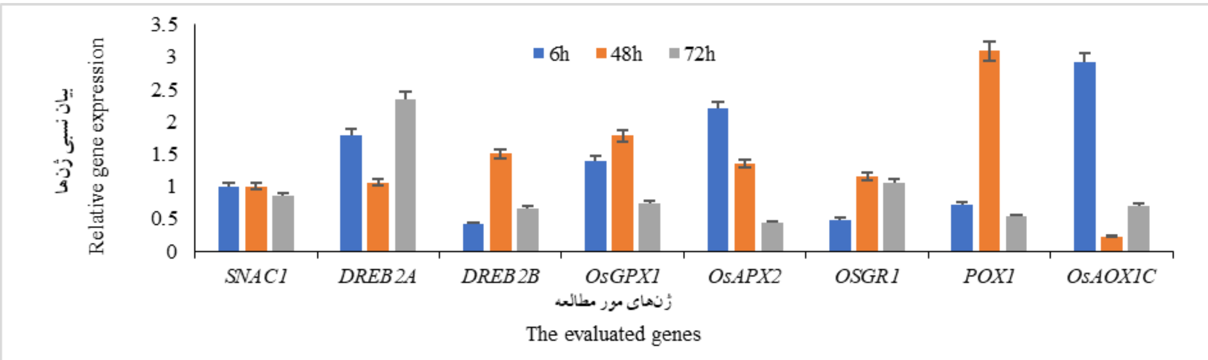
شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های جهش یافته انتخابی و ارقام شاهد برنج در برهمکنش تیمارهای ژنوتیپ و تنش شوری و زمان پس از اعمال شوری

Fig. 3. Mean comparison of ascorbate peroxidase enzyme activity in selected mutant genotypes and control cultivars of rice in interaction of genotype × salinity × time after salinity application

برهمکنش ژنوتیپ و شوری نشان داد که ژنوتیپ جهش یافته *em*$_4$*hs290* در تیمار شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر بیشترین (۴/۴) و در تیمار بدون تنش کمترین (۳/۵۵ میکرومول در دقیقه بر میلی گرم پروتئین) فعالیت آسکوربات پراکسیداز را داشت. میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ جهش یافته *em*$_4$*hs84* تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت. سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد، اما روند آن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود، به‌طوریکه در ژنوتیپ *em*$_4$*hs290* با ۲۴ درصد بیشترین و در ژنوتیپ *em*$_4$*hs84* با پنج درصد کمترین فعالیت را در مقایسه با شرایط بدون تنش داشت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش شوری نسبت به شرایط بدون تنش افزایش معنی‌داری داشت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های رقم IR28 و والد هاشمی بعد از گذشت ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از اعمال تنش شوری در مقایسه با تیمار بدون تنش به جز در تیمار ۴۸ ساعت در رقم والد هاشمی کاهش یافت (شکل ۳). فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ جهش یافته *em*$_4$*hs84* در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از تنش شوری افزایش داشت (شکل ۳). در ژنوتیپ جهش یافته *em*$_4$*hs290* در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش و رقم متحمل FL478 در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش، افزایش داشت. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام متحمل به شوری (Moradi and Ismail, 2007) و کاهش (Moradi and Ismail, 2007; Chawla *et al.*, 2013) یا عدم تغییر (Demiral and Turkan, 2005) فعالیت آن در ارقام حساس برنج گزارش شده است. نتایج این

آزمایش نشان داد که واکنش ژنوتیپ‌های برنج در تحمل تنش شوری یکسان نبود که این موضوع نشان‌دهنده سطح متفاوت تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از اعمال تنش شوری است. ویژگی تحمل به شوری در گیاهچه‌های برنج با سطح بالای آنتی‌اکسیدانی و فعالیت بیشتر آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز مرتبط است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز (POX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل و رقم متحمل به طور قابل توجهی بالاتر از ارقام شاهد بود که این موضوع به کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش تحمل آنها به تنش شوری کمک می‌کند (Sahoo *et al.*, 2022). به‌نظر می‌رسد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سازوکار دفاعی بسیار مهمی محسوب شده و افزایش فعالیت آنها در هنگام وقوع تنش شوری می‌تواند باعث کاهش خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو شده و یا از وقوع آن جلوگیری کند.

در این تحقیق بیان نسبی ژن‌های مؤثر در دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل رونویسی مرتبط با تنش اسمزی (*DREB2A*، *DREB2B* و *SNAC1*) و ژن‌های کلیدی تنش اکسیداتیو (*OsGPX1*، *OsGR1*، *OsAOX1C*، *POX1* و *OsAPX2*) در پنج ژنوتیپ برنج شامل رقم والد محلی هاشمی، رقم حساس IR28، رقم متحمل FL478، ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل به تنش شوری *em₄hs290* و *em₄hs84* با استفاده از qRT-PCR ارزیابی شد. نتایج حاصله نشان دهنده تنوع در بیان ژن‌های یاد شده در شرایط تنش شوری بود (شکل ۴). نتایج نشان داد که در شرایط تنش شوری ژن‌های *OsGR1*، *DREB2B*، *OsAOX1C* و *POX1* به‌ترتیب بیشترین واکنش را داشته و سایر ژن‌ها حداقل تغییرات در بیان را نشان دادند. برای ژن‌های *DREB2B* و *POX1* میزان بیان مشاهده شده نسبت به تیمار بدون تنش به جز زمان ۴۸ ساعت، کمتر بود که این موضوع نشان‌دهنده کمترین اثر این ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری در ژنوتیپ‌های متحمل است. بیان ژن‌های *OsGR1*، *OsGPX1*، *POX1* و *DREB2B* در زمان‌های ۶ و ۴۸ ساعت پس از تنش در مقایسه با تیمار بدون تنش افزایش داشت، اما در زمان ۷۲ ساعت، کاهش یافت. بیشترین میزان بیان ژن‌های گروه تنش اکسیداتیو مربوط به ژن *POX* در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش شوری بود و بالاترین میزان بیان ژن‌های گروه تنش اسمزی در ژن *DREB2A* در ۷۲ ساعت پس از تنش شوری مشاهده شد (شکل ۴).



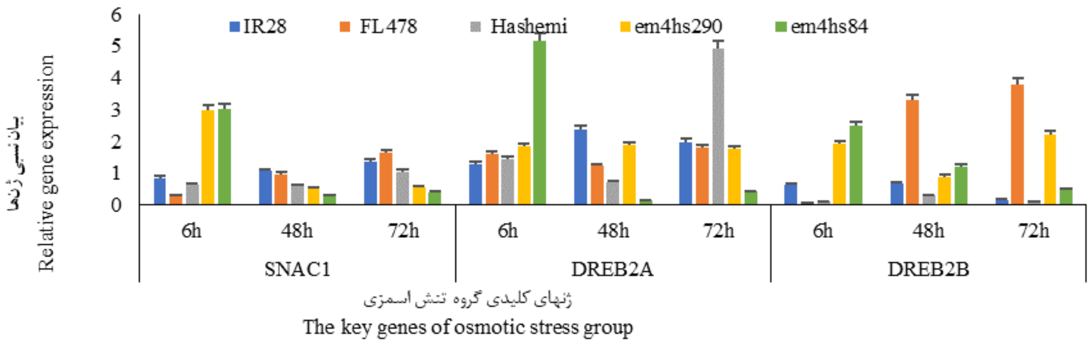
شکل ۴- تغییر در بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تنش‌های اکسیداتیو و اسمزی در زمان‌های پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ‌های برنج

Fig. 4. Changes in relative expression of the oxidative stress related genes in different time points in response to salt stress in rice genotypes

در تنش شوری، بیان نسبی ژن‌های گروه تنش اسمزی (*DREB2A*، *DREB2B* و *SNAC1*) در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل *em₄hs290* و *em₄hs84* بالاتر از ژنوتیپ حساس بود، اما بعد از طولانی شدن زمان تنش، بیان نسبی ژن‌ها در این ژنوتیپ‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد، اگرچه کاهش سطح بیان در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs84* بیشتر بود (شکل ۵). این موضوع نشان‌دهنده حفظ هموستازی کندتر ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل است. نتایج سایر تحقیقات روی ژن *SNAC1* نشان داده است که این ژن یک جزء کلیدی در پاسخ به تنش در برنج است (Hu *et al.*, 2006).

بیان ژن *SNAC1* در اثر خشکی، شوری، سرما و تیمار با اسید آبسزیک القاء می‌شود. بیان بالای این ژن باعث افزایش تحمل به شوری شده و هیچگونه اثر منفی روی رشد و تولید محصول در گیاه برنج ندارد (Li *et al.*, 2019). ژن‌های *DREB2A* و *DREB2B* نیز میزان بیان بالاتری را در ژنوتیپ حساس در زمان ۴۸ ساعت پس از تنش نشان داد، اما این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل در مراحل اولیه تنش افزایش بیان داشت، بنابراین به نظر می‌رسد که پاسخ به تنش شوری در مراحل اولیه در ژنوتیپ متحمل بروز می‌کند، اما در شوری طولانی مدت ژنوتیپ حساس به تنش پاسخ بیشتری دارند، زیرا الگوی بیان بعد از ۶ ساعت تنش شوری نسبت به زمان‌های طولانی‌تر متفاوت بود.

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کد کننده گروه تنش اکسیداتیو (*OsGPX1*، *OsGR1*، *OsAOX1C*، *POX1* و *OsAPX2*) نشان داد که بیان این ژن‌ها با توجه به ژنوتیپ و زمان اعمال تنش شوری متفاوت هستند. بیان ژن‌های این گروه در زمان ۶ ساعت پس از تنش در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل به طور معنی‌داری بالاتر از ژنوتیپ حساس بود، اما بعد از طولانی شدن زمان تنش کاهش معنی‌داری در این ژنوتیپ‌ها مشاهده شد، گرچه کاهش سطح بیان در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs84* شدیدتر بود (شکل ۶). این موضوع نشان‌دهنده سرعت واکنش ژنوتیپ متحمل برای حفظ هموستازی یونی در مقایسه با ژنوتیپ حساس است. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل *em₄hs290* و *em₄hs84* در زمان‌های پس از اعمال تنش متفاوت بود.



شکل ۵- تغییر در بیان نسبی ژن‌های گروه تنش اسمزی در زمان‌های پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ های برنج

Fig. 5. Changes in relative expression of the osmotic stress related genes in different time points in response to salt stress in rice genotypes

ژن *OsAOX1C* میزان بیان ژن بالایی را در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل *em₄hs290* و *em₄hs84* در ساعات اولیه تنش نشان داد. بالاترین میزان بیان ژن‌های *OsAPX₂* و *POX1* در زمان ۶ ساعت پس از

اعمال تنش شوری بود که در زمان‌های بعدی تنش کاهش نشان دادند. میزان بیان رونوشت‌های ژن *OsAPX₂* در زمان‌های پس از اعمال تنش شوری به‌طور معنی‌داری تغییر یافت. آنزیم APX نقش مهمی در پاکسازی پراکسید هیدروژن درون سلول‌ها دارد. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که تغییر در فعالیت آنزیم APX با میزان رونوشت‌های ژن *OsAPX2* همبستگی دارد (Jin *et al.*, 2006). به نظر می‌رسد که سیستم دفاعی اکسیداتیو بوسیله میزان رونویسی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی تنظیم می‌شود. مقایسه میزان بیان نسبی ژن *POX1* در رقم IR28 نسبت به ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل مورد مطالعه و رقم هاشمی نیز نشان داد که میزان بیان آن در ژنوتیپ‌های جهش یافته و رقم هاشمی در ساعات اولیه پس از اعمال تنش از رقم شاهد بیشتر بود.

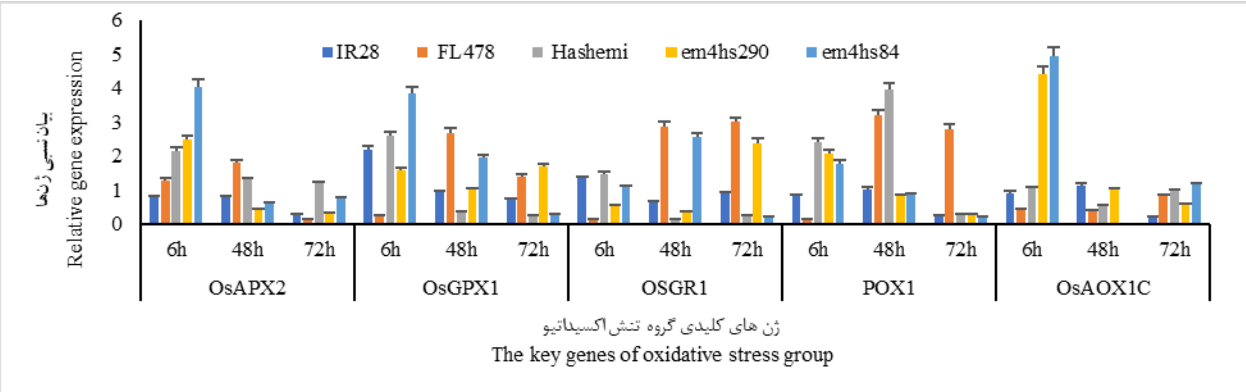
ارزیابی بیان ژن گلوتاتین پراکسیداز (*OsGPX1*) نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در ژنوتیپ جهش یافته *em₄hs84* در ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد و سپس در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش، میزان بیان این ژن به طور قابل ملاحظه و معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۶). بیان ژن *OsGPX1* در رقم حساس IR28 نیز با افزایش زمان تنش کاهش یافت به این ترتیب که در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن مجدداً کاهش یافته و در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش به حداقل مقدار رسید. مقایسه میزان بیان این ژن در دو رقم شاهد متحمل و حساس نشان داد که هر چند این ژن در رقم حساس در ساعات اولیه تنش بیان داشت، اما میزان بیان آن در رقم متحمل FL478 و ژنوتیپ‌های جهش یافته *em₄hs290* و *em₄hs84* در زمان‌های بعدی بسیار بیشتر از رقم حساس بوده و تفاوت آنها معنی‌دار بود.

نتایج حاصل نشان دهنده افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *POX1*، *OsGR1*، *OsGPX1* و *OsAPX2* و کاهش معنی‌دار بیان ژن *DREB2B* در رقم هاشمی در نمونه‌های تحت تنش (۶ ساعت)، افزایش معنی‌دار بیان ژن *POX1* و کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *OsGPX1* و OsGR1 در رقم هاشمی در نمونه‌های تحت تنش (48 ساعت) و افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *OsAOX1C*، *SNAC1* و *DREB2A* و کاهش معنی‌دار بیان ژن *POX1* در رقم هاشمی در نمونه‌های تحت تنش (۷۲ ساعت) در مقایسه با شاهد است.

در ژنوتیپ متحمل FL478 بالاترین میزان بیان ژن برای *POX1* و *OsGR1* در ۷۲ ساعت پس از تنش شوری مشاهده شد. به طور مشابه ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs84* بالاترین میزان بیان برای ژن *OsAPX2* و *OsAOX1C* در ۶ ساعت پس از تنش و ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs290* بالاترین میزان بیان برای ژن *OsAOX1C*در ۶ ساعت پس از تنش و *OsGR1* در ۷۲ ساعت پس از تنش را نشان داد. در ژنوتیپ حساس افزایش در بیان همه ژن‌ها به جز ژن‌های *OsGR1* و *OsGPX1* برای زمان ۴۸ ساعت پس از تنش مشاهده شد، در صورتیکه بیان این ژن‌ها در زمان ۷۲ ساعت به جز ژن *OsGR1* و *SNAC1* پس از تنش در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. در رقم حساس IR28 افزایش بیان ژن‌های *OsAOX1C* و *POX1* در تیمارهای تنش ۶ و ۴۸ مشاهده شد و بالاترین میزان آن بعد از 48 ساعت ثبت شد، در حالی که بیان ژن‌های *OsGR1* و *OsGPX1*، ۴۸ ساعت پس از تنش شوری کاهش یافت که این موضوع نشان‌دهنده پاسخ متفاوت دو ژن در این ژنوتیپ است (شکل ۶). ژن‌های *SNAC1*، *DREB2A*، *DREB2B*، *POX1*، *OsAOX1C* و *OsAPX2* در رقم حساس IR28 در زمان 48 ساعت بالاترین میزان بیان را داشتند، اما با طولانی شدن دوره تنش کاهش یافت. ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل به‌طور قابل توجهی سطح بالاتر بیان ژن‌های مورد مطالعه را حتی در شرایط بدون تنش داشت، در نتیجه بیان این ژن‌ها پس از تنش شوری در ژنوتیپ متحمل کاهش یافت، اما در ژنوتیپ‌های متحمل در مراحل اولیه تنش القاء می‌شود.

میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در رقم حساس IR28 در ۷۲ ساعت پس از تنش در ژن‌های *SNAC1* و *OsGR1* افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده پاسخ متفاوت دو ژن در این رقم است.

افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *SNAC1*، *DREB2B*، *OsAOX1C*، *POX1* و *OsAPX2* و کاهش معنی‌دار بیان ژن *OsGR1* در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs290* در نمونه‌های تحت تنش (۶ ساعت)، کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *SNAC1*، *OsAOX1C*، *OsGPX1* و *OsAPX2* در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs290* در نمونه‌های تحت تنش (۴۸ ساعت) و افزایش معنی‌دار بیان ژن *OsGR1* و کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *OsAOX1C*، *OsAPX2* و *POX1* در ژنوتیپ جهش یافته *em₄hs290* در نمونه‌های تحت تنش (۷۲ ساعت) در مقایسه با شاهد باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری شد. در ژنوتیپ جهش یافته *em₄hs290* در سطح بیان ژن *DREB2A* در نمونه‌های تحت تنش در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت.



شکل ۶- تغییر در بیان نسبی ژن‌های تنش اکسیداتیو در زمان‌های پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ های برنج

Fig. 6. Changes in relative expression of the oxidarive stress related genes in in different time points in response to salt stress in rice genotypes

نتایج حاصل نشان دهنده افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *OsGPX1*، *DREB2A*، *SNAC1* و *OsAOX1C* و *OsAPX2* و کاهش معنی‌دار بیان ژن *OsGR1* در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs84* در نمونه‌های تحت تنش (۶ ساعت)، افزایش معنی‌دار بیان ژن *OSGR1* و کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *SNAC1*، *DREB2A*، *OsAOX1C*، *OsGPX1* و *OsAPX2* در ژنوتیپ جهش یافته متحمل *em₄hs84* در نمونه‌های تحت تنش (۴۸ ساعت) و افزایش معنی‌دار بیان ژن *AOX* و کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *OsGR1*، *DREB2B*، *OsGPX1* و *POX1* در ژنوتیپ جهش یافته *em₄hs84* در نمونه‌های تحت تنش (۷۲ ساعت) در مقایسه با شاهد بود. تنظیم رونویسی در شرایط شوری یک روش رایج سازگاری در گیاه است که اثرات نامطلوب غلظت بالای نمک را با هموستازی سلول و تعادل اسمزی کاهش می‌دهد (Mallikarjuna *et al*., 2011). ارزیابی فراوانی رونویسی در پاسخ به تنش شوری، برآورد قابل اعتمادی از فعال شدن ژن یا کاهش رونویسی است (Liao *et al*., 2016).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای در گیاه برنج خسارت‌زا است، با این وجود تنوع ژنتیکی قابل توجهی در تحمل به شوری در

ژنوتیپ‌های جهش یافته و ارقام شاهد متحمل و حساس وجود داشت. علیرغم رفتار متفاوت فعالیت آنزیمی در مقابله با تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه، به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیمی و افزایش تولید متابولیت‌ها در ارقام متحمل باعث کاهش تنش اکسیداتیو و تحمل آنها به شوری شد. این نتایج نشان می‌دهد که پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش شوری به دلیل ایجاد تغییر در مسیرهای متابولیکی بوده است. نتایج نشان داد که تنش شوری در ارقام حساس، باعث القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال و وقوع تنش اکسیداتیو و ایجاد خسارت در غشاهای سلولی می‌شود، در صورتیکه در ارقام متحمل به شوری تولید گونه‌های اکسیژن فعال یا تنش اکسیداتیو کمتر بوده و یا باعث خسارت کمتری به غشاهای سلولی می‌شود. الگوی بیان ژن‌های *DREB2A* و *DREB2B* در ژنوتیپ‌های جهش یافته متحمل و ارقام شاهد در شرایط تنش شوری نشان داد که این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های متحمل میزان بیان بالاتری در مراحل اولیه تنش شوری داشتند. این ژن‌ها در دوره‌های طولانی مدت تنش نیز القاء شدند، ولی میزان بیان آنها در هر دو ژنوتیپ یکسان بود. تجمع بالای یون سدیم در بافت‌های ژنوتیپ حساس باعث تنش اکسیداتیو می‌شود که می‌تواند با بیان ژن‌های *OsAOX1C*، *OsGPX1* و *OsAPX2* منعکس شود. میزان بیان ژن‌های *OsGR1* در ژنوتیپ‌های حساس نسبت به ژنوتیپ‌های متحمل بالاتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر است و به همین علت میزان بیشتری از آنزیم برای حفظ هموستازی در شرایط تنش مورد نیاز است. مقدار گونه‌های فعال اکسیژن و ژن‌های *OsAOX1C*، *OsGPX1* و *OsAPX2* با تحمل شوری در برنج ارتباط مثبت دارند. تجزیه و تحلیل بیان ژن های گروه اکسیداتیو نشان داد که ژن *OsAPX2* بارزترین ژن واکنش دهنده به تنش شوری در هردو ژنوتیپ جهش یافته بود. با توجه به اینکه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان دهنده افزایش حذف گونه‌های فعال اکسیژن است، اغلب از این ویژگی به‌عنوان یک شاخص قابل اعتماد جهت ارزیابی تحمل شوری استفاده می‌شود. این عوامل به‌عنوان بهترین شاخص تفکیکی برای گزینش و اصلاح برنج برای تحمل به شوری محسوب می‌شوند. علاوه براین می‌توان از نشانگرهای خاص برای این ژن‌ها و غربالگری ژرم پلاسم برنج برای تحمل به شوری که نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه و تولید ارقام جدید متحمل به تنش شوری است، استفاده کرد.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات برنج کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری شمال کشور و دانشگاه گیلان برای حمایت‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biol*ogy, 55, pp.373-399. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Bian, S. and Jiang, Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, 120(2), pp.264-270. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.014

Celik, O., Cakır, B. C. and Atak, C. 2019. Identification of the antioxidant defense genes which may provide enhanced salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, pp.85-99.

https://doi.org/10.1007/s12298-018-0618-0

Chance, B. and Maehly, A.C. 1995. An assay of catalase and peroxidase. pp. 764–791. *In:* Colowick, S.P. and Kapland, N.D. (Eds.) Method in Enzymology, Academic Press, New York. USA. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8

Chawla, S., Jain, S. and Jain, V. 2013. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, pp.27-34. https://doi.org/10.1007/s13562-012-0107-4

Claiborne, A. 1985. Catalase activity. pp. 83-284. *In:* Greenwald, R.A. (Ed.) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL. USA. https://doi.org/10.1201/9781351072922

Demiral, T. and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany,* 53, pp.247-57. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.017

Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry,* 48, pp.909-930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Kordrostami, M., Rabiei, B. and Hasani-Kumleh, H. 2017. Different physiobiochemical and transcriptomic reactions of rice (*Oryza sativa L.*) cultivars differing in terms of salt sensitivity under salinity stress. *Environmental Science and Pollution Research,* 24(8), pp.7184-7196. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8411-0

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L. and Masmoudi, K. 2016. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science,* 29(7), 99.1787. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787

He, J., Ren, Y., Chen, X. and Chen, H. 2014. Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 108, pp.114-119. https://doi.org/ 10.1016/j.ecoenv.2014.05.021

Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. and Xiong, L. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), pp.12987-12992. https://doi.org/10.1073/pnas.0604882103

Huang. S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., Niu, X., Fei, Z., Cao, S. and Liu, Y. 2012. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. Molecular Genetics and Genomics, 287(6), pp.495-513. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.021

Jin, J., Shan, N., Ma, N., Bai, J. and Gao, J. 2006. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L. cv. Samantha). *Postharvest Biology and Technology,* 40, pp.236-243. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.01.014

Khazaie, L., Shirzadian-Khorramabad, R., Ebadi, A. A. and Moumeni, A. 2023. Assessing salinity tolerance in

rice (*Oryza sativa* L.) mutant genotypes (M_3) with emphasis on stress tolerance indices in seedling stage. *Journal of Crop Breeding*, 15 (43), pp.3-23. [In Persian]. https://jcb.sanru.ac.ir/article-1-1359-en.html

Kumar, V., Shiram, V., Jawali, N. and Shitole, M.G. 2007. Differential response of indica rice genotypes to NaCl stress in relation to physiological and biochemical parameters. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 48, pp.339-344. https://doi.org/10.1080/03650340701576800

Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 158(6), pp.737-745. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00174

Li, X., Chang, Y., Ma, S., Shen, J., Hu, H. and Xiong, L. 2019. Genome-wide identification of *SNAC1*-targeted genes involved in drought response in rice. *Frontiers in Plant Science*, 10, pp.982. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00982

Liao, Y. D. Lin, K.H., Chen, C. C. and Chang, C. M. 2016. *Oryza sativa* protein phosphatase 1a (OsPP1a) involved in salt stress tolerance in transgenic rice. *Molecular Breeding*, 36, pp.1-19. https://doi.org/10.1007/s11032-016-0446-2

Lutts, S., Kinet, M. J. and Bouharmont, J. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46(12), pp.1843-1852. https://doi.org/10.1093/jxb/46.12.1843

Mallikarjuna, G., Mallikarjuna, K., Reddy, M. K. and Kaul, T. 2011. Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology Letters*, 33, pp.1689-1697. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0620-x

Mandhania, S., Madan, S. and Sawhney, V. 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Plant Biology*, 50, pp.227-231. https://doi.org/10.1007/s10535-006-0011-7

Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2010. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 283, pp.185-196. https://doi.org/10.1007/s00438-009-0506-y

Moradi, F. and Ismail, A. M. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*, 99, pp.1161-1173. https://doi.org/10.1093/aob/mcm052

Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, pp.867–880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232

Nongpiur, R. C., Singla-Pareek, S. L. and Pareek, A. 2020. The quest for osmosensors in plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(2), pp.595-607. https://doi.org/10.1093/jxb/erz263

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise

comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Oxford University Press. 30, pp.1-10. https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36

Sahoo, R. K., Tuteja, R., Gill, R., Jiménez Bremont, J. F., Gill, S. S. and Tuteja, N. 2022. Marker-free rice (*Oryza sativa* L. cv. IR 64) overexpressing *PDH45* gene confers salinity tolerance by maintaining photosynthesis and antioxidant Machinery. *Antioxidants,* 11(4), pp.770. https://doi.org/10.3390/antiox11040770

Scandalios, J. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 38(7), pp.995-1014. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003

Shahid, S. A., Zaman, M. and Heng, L. 2018. Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem. *In:* Zaman, M., Shahid, S.A., Heng, L. (Eds.) Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques, Springer International Publishing, Switzerland. p. 43-53 . https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2

Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H. and Gomez, K. A. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice (3rd Ed). IRRI, Los Baños, Philippines. https://doi.org/10.4236/as.2023.141005

Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W. and Zhang, H. 2010. The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 457, pp.1-12. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.02.011